Aus dem Pharmakologischen Institut der
Ruprecht-Karl-Universität zu Heidelberg.
Direktor: Professor Dr. Fr. Eichholtz.

STANFORD UNIVERSITY
MAR
8
LIBRARY

Lane Medical Library

Untersuchungen über die Fähigkeit der Bildung von Acetylcholin durch verschiedene Milchsäurebakterien. Stoffwechselvergleich acetylcholin-positiver und -negativer Stämme.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karl-Universität zu Heidelberg.

Vorgelegt von
Erich Niederdeppe
Zahnarzt.

Ph. Pfeiffer's Buchdruckereien und Verlage Kaiserslautern.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Dekan:	Referent:
Prof. Dr. Runge	**Prof. Dr. Eichholtz**

Keil und Pörtner isolierten aus Sauerkraut, sowie aus sauren Gurken einen Mikroorganismus, der die bedeutsame Eigenschaft aufweist, Acetylcholin zu bilden und deshalb vorläufig den Namen Bacterium acetylcholini (Keil) erhielt. Eine Acetylcholinbildung bei Mikroorganismen war bis dahin unbekannt und es gelang den erstgenannten Autoren auch nicht, andere, selbst nahe verwandte Organismen zu finden, die diese Fähigkeit besitzen. Untersucht wurden Oidium lactis, Penicillium glaucum, Saccharomyces cerivisae, Torula- und Amylobakterarten, ferner Bact. coli, Bact. prodigiosum, Bact. violaceum, Staphylococcus pyogenes und Streptococcus acidi lactici, schließlich eine große Anzahl (30 Stück) von Reinkulturen verschiedener Bakterien aus Milch, Kot und Rachenabstrichen. Die Prüfung weiterer Organismen, besonders von Milchsäurebakterien, wurde von Keil und Pörtner in Aussicht gestellt.

Möller und Ferdinand untersuchten dann acetylcholinbildende Reinkulturen, die den verschiedensten, dem Handel entnommenen eingesäuerten Gemüsen und einer Mischsilage (von Mais und Sonnenblumen) entstammten; Möller und Mai solche aus einer Rübenschnitzelsilage, aus verschiedenen Proben von norwegischem Sauerkraut, von Salzfischen (Rackurret) und aus Kot; Thoma schließlich Kulturen aus gesunden und kariösen Zähnen. Alle diese Stämme zeigten, soweit untersucht, eine weitgehende Uebereinstimmung in ihren wichtigsten Stoffwechseleigenschaften und konnten von Habs auch bakteriologisch als einheitlich gekennzeichnet werden, und zwar als eine Untergruppe der Enterokokken.

Es gelang jedoch umgekehrt, acetylcholin-negative Stämme aus Kot und Milch zu züchten, die sich qualitativ im Stoffwechsel und in den übrigen bakteriologischen Eigenschaften nur wenig vom Bact. acetylcholini unterscheiden, und die als die eigentlichen Enterokokken anzusprechen sind. Nur ein einziger Unterschied zwischen acetylcholin-positiven und acetylcholin-negativen Enterokokken ist deutlich: Die ersteren sind mehr an das pflanzliche, die letzteren weitgehend an das tierische Medium angepaßt. Darauf sind sicherlich auch zum größeren Teil die quantitativen Unterschiede des Stoffwechsels zwischen acetylcholin-positiven und -negativen Stämmen zurückzuführen. Uebergänge zwischen beiden Untergruppen erscheinen nach den erfolglosen Umzüchtungsversuchen von Habs, ferner von Möller und Mai wenig wahrscheinlich, jedoch dürften Uebergangsformen, die allerdings in Pflanzensäften z. T. nur wenige Generationen überstehen, nach Stoffwechseluntersuchungen von Möller und Mai, sowie von Frey vorkommen.

I. Untersuchung verschiedener Bakterien auf die Fähigkeit zur Acetylcholinbildung.

Die Wahrscheinlichkeit, daß nur eine Untergruppe der Enterokokken die Fähigkeit besitzen sollte Acetylcholin zu bilden, erschien mir auf Grund des vorliegenden Materials noch gering. Ich nahm deshalb erneut die Versuche auf, nach anderen Bakterien, besonders Milchsäurebakterien zu suchen, die diese Eigenschaften zeigen. In der Tabelle I sind die von mir untersuchten Bakterien, ihre Herkunft und die Art der Züchtung verzeichnet.

Nach Ueberimpfung auf sterilen Gurkensaft zeigte sich, daß unter den 17 verschiedenen Stämmen tatsächlich 3 in der Lage waren, Acetylcholin zu bilden: Bact. cucumeris fermentati (Henneberg), Bact. utile (Henneberg) und Streptobact. plantarum (Orla-Jensen). Es erhob sich aber sofort die Frage, ob diese Bakterien wirklich andere Arten als Bact. acetylcholini darstellen, oder mit diesem zu mindest nahe verwandt oder gar identisch sind. Es darf darauf hingewiesen werden, daß die Charakterisierung an und für sich schon nah verwandter Stämme durch die Methoden von Henneberg heute nicht mehr von allen Bakteriologen als ausreichend anerkannt wird. Ferner liegt das Bestreben vor, die nach dem System von Orla-Jensen bezeichneten Stämme in das System, das in der medizinischen Bakteriologie üblich ist, einzuordnen. Es ergab sich somit die Notwendigkeit, eingehende vergleichende Untersuchungen der vorliegenden Bakterien durchzuführen. Der mehr bakteriologische Teil dieser Aufgabe wurde von Habs und Mitarbeitern in Angriff genommen, der Vergleich des Stoffwechsels und seine Beeinflussung durch verschiedene Zusätze und bei verschiedenen Bedingungen wurde in dieser Arbeit nach den Methoden von Möller und Mitarbeitern durchgeführt. (Die p_H-Werte wurden nicht mehr mit dem Apparat nach G. Roeder, sondern mit dem Jonometer der Firma Lautenschläger, München bestimmt).

II. Orientierender Vergleich der 17 Stämme.

In der ersten Versuchsreihe wurden deshalb sämtliche Stämme auf verschiedene Pflanzenpreßsäfte überimpft, und Wachstum, Säuerung (p_H) und Acetylcholinbildung bei 25° C und 38° C unter aeroben und anaeroben Bedingungen geprüft. Aus den Aufstellungen in den Tabellen II, II a und II b geht hervor, daß die meisten Stämme nur mäßig in den Pflanzensäften wachsen; dies ist verständlich, da sie meist typische Vertreter der Milchflora darstellen, und im allgemeinen weniger dem pflanzlichen Medium angepaßt sind. Die in Milch gezüchteten Stämme B_4 bis B_8 wuchsen in Möhren-, Weißkraut- und Gur-

Tabelle I.

Aufstellung der untersuchten Stämme

Nr.	Wissenschaftlicher Name	Herkunft	Kulturmedium
B 9	Termobact. mobile (Lindner)	Institut für Gärungsgewerbe Berlin (Originalstämme von Prof. Henneberg)	B 9, B 1–3 verzuckerte Malzmaische von 4° Balling + 1% Pepton + 2% Kreide + 1% Dextrose + 0.5% Lactose + 0.5% Hefe-Autolysat
B 1	Bact. cucumeris fermentati		
B 2	Bact. lactis acidi (Leichmann)		
B 3	Bact. utile		
B 4	Bact. (=Streptococcus) lactis acidi		
B 5	Bact. bulgaricum		
B 6	Streptococcus lactis		
B 7	Streptococcus thermophilus		
B 8	Bact. acidophilum		B 4–8 in steriler Milch
M 10	Thermobact. helveticum (casei ε)	Süddeutsche Versuchs- u. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan (Prof. Demeter) (Nomenklatur nach Orla-Jensen)	
M 11	Thermobact. bulgaricum		
M 12	Streptococcus cremoris + Strept. lactis (Kulturrassen)		M 10–15 Lackmusmilch
M 13	Streptococcus lactis (wilde Rasse)		
M 14	Streptobact. casei α		
M 15	Streptococcus thermophilus		
P 24	Streptobact. plantarum [1])	Biotechnisch-chem. Institut der Technischen Hochschule Kopenhagen (Prof. Orla-Jensen)	
C 11	Streptobact. casei [2])		

[1]) aus silierten Kartoffeln (Orla-Jensen)
[2]) aus Emmentaler Käse (Freudenreich)

kensaft unter aeroben Bedingungen sowohl bei 25° C als auch bei 38° C äußerst schwach und säuerten dementsprechend wenig oder gar nicht. Wurde durch Paraffinüberschichtung der Sauerstoffzutritt verhindert, so war allgemein das Wachstum stärker, besonders in Möhrensaft und bei 25° C. Bei den Münchener Stämmen M_{10} bis M_{15} (Tabelle II a), die ebenfalls auf Milch gezüchtet waren, war das Wachstum und die Säuerung in Gurken-, Birnen- und Weißkrautsaft noch schwächer. Die bei verschiedenen Temperaturen und unter Sauerstoffausschluß erhaltenen Ergebnisse schwankten stark. Auffallend erschien nur die recht gute Säuerung durch Streptobact. casei α (M_{14}) besonders unter aeroben Bedingungen und zwar nur in Weißkrautsaft, ohne daß dabei besonders gutes Wachstum aufgetreten wäre. Unter diesen Umständen war eine Acetylcholinbildung, die selbst bei typischen Vertretern des Bact. acetylcholini nur bei üppigem Wachstum frühzeitig (d. h. nach 3—4 Tagen) auftritt, kaum zu erwarten, und wurde auch nach 6—7 Tagen in keinem Falle beobachtet.

Bei den übrigen Milchsäurestämmen (s. Tabellen II und II b), die in den Pflanzensäften gut bis üppig wuchsen, war die Möglichkeit der Acetylcholinbildung größer; zumal diese Stämme mit Ausnahme des Bact. utile (B_3) von Henneberg, Orla-Jensen und anderen Forschern (s. b. Ruschmann) als typische Vertreter der Silageflora anzusehen sind.

Das Bact. cucumeris fermentati (B_1) wuchs am besten in Möhrensaft bei 38° C, gleichgültig ob die Verhältnisse aerob oder anaerob waren. In Weißkrautsaft war das Wachstum auffallend schlecht, bei 25° besonders unter anaeroben Bedingungen noch am günstigsten. In Gurkensaft zeigte sich dagegen wieder besseres Wachstum bei 38° C. Nach 7 Tagen wurde der p_H in allen Fällen zu 3.61 ± 0.07 gefunden (Eine Ausnahme: Weißkrautsaft, aerob, 38° C, $p_H = 4.75$, schlechtes Wachstum). Acetylcholin war bei 25° C immer vorhanden, bei 38° C in 7 von 9 Fällen, eine Schwankung, die auch das Bact. acetylcholini bei dieser Temperatur zeigt (Möller und Ferdinand). Ferner sei noch erwähnt, daß in Birnensaft (in der Tabelle II nicht aufgeführt) ebenso schlechtes Wachstum und keine Acetylcholinbildung durch Bact. cucumeris fermentati auftritt, wie es für Bact. acetylcholini bekannt ist. Ein grundlegender Unterschied aber besteht darin, daß Bact. cucumeris fermentati im Gegensatz zum Bact. acetylcholini ein kräftiger Gasbildner ist.

Das Bact. lactis acidi (Leichmann) (B_2) wächst in allen Pflanzensäften und zwar aerob deutlich besser als anaerob, ohne Unterschiede zwischen 25° C und 38° C. Acetylcholin war in keinem Falle nachzuweisen. Die Säuerung war praktisch bis auf eine Ausnahme wieder gleich $p_H = 3.55 \pm 0.14$. CO_2-Bildung war vorhanden.

Bact. utile (B_3) gehört nach Henneberg nicht zur Silageflora, sondern wird wegen seiner geringen Essigsäurebildung in vielen Hefefabriken als nützliches „Flockenmilchsäurebakterium" benötigt. Es wuchs aerob besser als anaerob und war bei 38° C deutlich geschädigt, besonders in Weißkrautsaft. Acetylcholin war bei 25° C immer vorhanden, bei 38° war die Bildung wieder schwankend. Die Säue-

		aerob									
		25° C						38° C			
		Wachstum [1]				p_H	A [2]	Wachstum			
	nach Tagen	1	2	4	7	7	7	1	2	4	7
	B 9	−?	−?	+−	+(+)	5.03	−	−	−?	+−	+(−)
	1	+−	+	+	+	3.58	+	+−	++	+++	+++
	2	−	+	++(+)	++(+)	3.59	−	+−?	+(+)	++(+)	+++
Möhrensaft	3	+?	+(+)	++(+)	+++	3.68	+	+−?	+(+)	++	++(+
$p_H = 5.05$	4	+−?	+−?	+−?	+−	4.27	−	+−?	+−?	+−?	+−?
bei B 9 = 5.00	5	+−?	+−?	+−?	+−?	4.64	−	+−?	+−?	+−?	+−?
	6	+−?	+−	+−	+−	5.02	−	−	+−?	+−?	+−?
	7	+−?	+−	+−?	+−?	5.00	−	+−?	+−?	+−?	+−?
	8	+−?	+−?	+−?	+−?	5.03	−	+−?	+−?	++	++
	B 9	−	−	−	−	4.95	−	−	−	−	−
	1	−	−?	+−	+(−)	3.54	++	−	−	−	−
	2	−	+	+(+)	++(+)	3.48	−	−	+	++	++(+
Weißkrautsaft	3	−	+	+(+)	+(+)	3.58	++	−	−	−	−
$p_H = 5.00$	4	+−?	+−?	+−?	+−?	4.96	−	+−?	+−?	+−?	+−?
bei B 9 = 4.97	5	+−?	+−?	+−?	+−?	4.94	−	+−?	+−?	+−?	+−?
	6	+−?	+−	+−	+−	4.99	−	−	+−?	+−?	+−?
	7	+−?	+−	+−?	+−?	4.99	−	+−?	+−?	+−?	+−?
	8	+−?	+−?	+−?	+−?	4.98	−	−?	+−?	+−?	+−?
	B 9	+−	+	+	+(+)	5.08	−	+−	+	+	+
	1	+−	+(−)	+(−)	+(−)	3.63	+	+−	+	+	+(+)
	2	+−	++	++	++(+)	3.46	−	+(+)	++	++(+)	++(+
Gurkensaft	3	+−	+	+(+)	+(+)	3.73	++	+	+	+	+(+)
$p_H = 4.81$	4	+−?	+−?	+−?	+−	4.23	−	+−?	+−?	+−?	+−?
bei B 9 = 5.20	5	+−?	+−?	+−?	+−?	4.67	−	+−?	+−?	+−?	+−?
	6	+−?	+−?	+−?	+−?	4.78	−	+−?	+−?	+−?	+−?
	7	+−?	+−?	+−?	+−?	4.81	−	+−?	+−?	+−?	+−?
	8	+−?	+−?	+−?	+−?	4.76	−	+−?	+−?	+−?	+−?

[1]) In dieser, sowie den weiteren Tabellen bedeuten die Zeichen zunehmende Trübung von

[2]) A = Acetylcholin. Die Zeichen bedeuten sinngemäß die abgeschätzte, relative Acetylcholi

I.

e B 1 — B 9 in verschiedenen Pflanzensäften.

	anaerob											
	25° C						38° C					
A	Wachstum				pH	A	Wachstum				pH	A
7	1	2	3	7	7	7	1	2	3	7	7	7
—	—?	+—?	+—?	+	5.10	—	—	—	—	—	5.01	—
+	+(—)	+	+(+)	++	3.64	+	+	++	++	++(+)	3.66	—
—	+	++	++	++	3.63	—	+(—)	+(+)	+(+)	+(+)	3.69	—
+	+(+)	+(+)	+(+)	++	3.63	+	+—	+	+(—)	+	3.67	+
—	+—?	+—?	+—	+	4.32	—	+—?	+—?	+—?	+	4.97	—
—	+—?	+—?	+—	+	4.42	—	+—?	+	+	+(+)	4.39	—
—	+—	+—	+(—)	+(+)	5.03	—	+—	+(—)	+	+	5.02	—
—	+—	+(—)	+	+(+)	5.05	—	+—	+	+	+	5.03	—
—	+—?	+—	+(—)	+	5.03	—	+—	+(—)	+	+(+)	4.12	—
—	—	—	+—?	++	5.04	—	—	—	—	—	4.92	—
—	—	+—?	+(+)	+(+)	3.59	++	—	—	—	+	3.52	++
—	+(—)	++	++	++	3.39	—	—	—	—	—	5.52	—
—	+—?	+(—)	+(—)	++	3.56	++	—	—	—	—	4.87	+
—	+—?	+—?	+—	+	5.00	—	+—?	+—	+—	+	4.93	—
—	+—?	+—?	+—	+	4.90	—	+—	+(—)	+	+	4.82	—
—	+—	+—	+(—)	+(+)	5.00	—	+—	+—?	+	+	4.97	—
—	+—?	+(—)	+(+)	++	5.00	—	+—	+	+	+	4.98	—
—	+—	+—	+—	+	5.03	—	+—	+(—)	+	+	4.93	—
—	+—	+	+	+(+)	5.09	—	+—	+(—)	+(—)	+(—)	5.20	—
+	+	+	+	+	3.65	+	+(—)	+	+	+(+)	3.68	+
—	+(—)	+(+)	+(+)	+(+)	3.67	—	+(—)	+	+(—)	+	3.60	—
++	+—	+(—)	+(—)	+	3.75	+	+—?	+—?	+—?	+—	3.83	+
—	+—?	+—?	+—?	+—	5.02	—	+—?	+—?	+—?	+—	5.02	—
—	+—?	+—?	+—?	+—	4.74	—	+—?	+—?	+—	+—	4.70	—
—	+—?	+—?	+—	+—	5.03	—	+—?	+—	+—	+—	5.02	—
—	+—?	+—	+	+(+)	5.06	—	+—?	+(—)	+(—)	+	5.04	—
—	+—?	+—	+(—)	+	4.26	—	+—?	+(—)	+	+	4.06	—

arem Wachstum +—? über +—, +(—), ++, ++(+) bis zum üppigen Wachstum +++.

Tabelle IIa.

Wachstum u. Säuerung der Stämme M 10—M 15 in verschiedenen Pflanzensäften.

		aerob								anaerob							
		25° C				38° C				25° C				38° C			
		Wachstum			pH	Wachstum			pH	Wachstum			pH	Wachstum			pH
	nach Tagen	1	3	6	6	1	3	6	6	1	3	6	6	1	3	6	6
Gurkensaft pH = 5.13	M 10	+—?	+–	+—	4.29	+—?	+—?	+–	4.26	+—	+—	+—	4.18	—?	+—?	+—	4.13
	11	+—?	+—?	+—?	4.37	+—?	+—?	+—?	4.39	+—	+—	+(—)	4.36	+—	+—?	+	4.33
	12	+—	+—	+—	4.35	+—	+—	+—	4.39	+—?	+—	+—	4.36	—?	+—?	+—?	4.37
	13	—?	+—?	+—	4.34	+—?	+—	+—	4.38	+—	+—	+—	4.33	+—?	+—?	+—	4.37
	14	—	+—?	+—?	4.33	—	—?	+—	4.27	—	—?	+—?	4.26	—?	—?	+—	3.96
	15	+—?	+—?	+—?	4.39	+—	+—	+—?	4.39	+—?	+—?	+—	4.40	+—	+—	+—?	4.37
Weißkrautsaft pH = 4.97	M 10	—?	+—	+—	4.80	+—?	+	+	4.08	+—?	+	+	4.62	+—?	+	+	3.95
	11	+—?	+—	+–	4.84	+–	+	+(+)	4.26	+—	+	+	4.66	+—	+	+(+)	4.15
	12	+—	+(—)	+	4.38	—?	+—?	+—	4.86	+—?	+	+(+)	4.39	—?	+—?	+—	4.90
	13	+—?	+—?	+—	4.31	+—	+	+	4.59	+—	+	+(+)	4.30	+—?	+	+	4.81
	14	—?	+—?	+	3.83	—	+	++	3.76	—?	—?	+	4.02	—	—?	+—	4.35
	15	+—	+—	+	4.92	—?	+—	+—	4.85	—?	+—?	+—?	4.88	—?	+—?	+(—)	4.88
Birnensaft pH = 4.43	M 10	+—?	+—	+	4.31	+—	+—	+	4.29	+—	+(—)	+	4.32	+—?	+	+	4.29
	11	+—?	+—?	+—	4.32	+—?	+—?	+—	4.30	+—	+—	+—	4.32	+—	+(—)	+	4.29
	12	+—?	+—?	+—?	4.31	+—	+(—)	+(—)	4.33	—?	+—	+	4.35	+—?	+—?	+—	4.35
	13	+—?	+—	+—	4.14	—?	+—?	+—	4.32	+—?	+—?	+—?	4.19	+—	+(—)	+	4.34
	14	+—?	+—?	+	4.30	+—	+	+	4.18	—?	—?	+—?	4.32	—?	—?	+—	4.12
	15	+—?	+—	+—	4.36	+—	+—	+	4.35	+—	+—	+	4.40	+—	+—	+—	4.33

Bei den in dieser Tabelle aufgeführten Stämmen konnte in keinem Falle Acetylcholin nachgewiesen werden.

Tabelle IIb

Wachstum, Säuerung u. Acetylcholinbildung der Stämme P 24 u. C 11 in Gurkensaft (pH = 5.05)

		25° C								38° C							
		Wachstum			pH			A.		Wachstum			pH			A.	
	nach Tagen	1	2	4	4	9	16	4	9	1	2	4	4	9	16	4	9
aerob	P 24	+	+	++	3.69	3.63	3.58	++	++	+	+(+)	++(+)	3.78	3.79	3.74	++	++
	C 11	—	+—	+(+)	3.81	3.60	3.53	—	—	+—	+	+(+)	3.68	3.53	3.63	—	—
anaerob	P 24	+	+	++(+)	3.70	3.68	3.59	++	++	+	+(+)	+++	3.71	3.73	3.74	++	+
	C 11	—	+—	+(+)	3.82	3.62	3.54	—	—	+—	+	+(+)	3.87	3.54	3.54	—	—

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153303_0005

rung in 10 von 12 Fällen (in 2 Fällen zeigte sich kein Wachstum) bewegte sich um p_H — 3.69 ± 0.14. Auch hier dürfte schwache CO_2-Bildung vorhanden sein.

Besonders interessant erschien mir von vornherein der Originalstamm P_{21} des Streptobacterium plantarum von Orla-Jensen (s. Tabelle II b), da er einer Kartoffelsilage entstammte. Dieser hatte die größte Aehnlichkeit mit einem typischen Stamm des Bact. acetylcholini. Er wuchs und säuerte in Gurkensaft sowohl aerob als anaerob gleich, der p_H erreichte schon nach 4 Tagen einen Mittelwert von 3.64 ± 0.06 bei 25° C bezw. 3.75 ± 0.04 bei 38° C. Acetylcholin war nach 4 Tagen überall vorhanden. Von größtem Interesse war schließlich, daß Streptobacterium plantarum im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Stämmen des Bact. acetylcholini anfangs kein Wachstum in Bouillon zeigte. Das Streptobacterium plantarum dürfte somit eine Grenzrasse des Bact. acetylcholini darstellen, die in ganz extremer Weise nur auf das pflanzliche Medium eingestellt ist.

Ein morphologisch sehr ähnlicher Stamm: Streptobacterium casei (Orla-Jensen) (C_{11}) wuchs und säuerte in Gurkensaft viel langsamer, bei 38° C zuerst etwas stärker als bei 25° C aber anaerob und aerob gleich. Das optimale Wachstum in Gurkensaft war geringer, das Säuerungsmaximum (nach 16 Tagen) jedoch etwas größer als bei Streptobacterium plantarum. Acetylcholin konnte jedoch selbst nach 16tägiger Bebrütung in Gurkensaft unter keiner Bedingung nachgewiesen werden.

Das einzige der hier untersuchten Bacterien schließlich, das nicht zu den Milchsäurebacterien gehört, ist das Termobacterium mobile (Lindner) (s. Tabelle II) (B_3). Auf Weißkraut- und Möhrensaft wuchs es fast gar nicht, Birnensaft wurde stark vergoren, auf Gurkensaft gedieh und gärte es mittelmäßig. Unter keinen Umständen trat jedoch eine nennenswerte Säuerung ein, Acetylcholinbildung wurde ebenfalls nie beobachtet.

Sämtliche Stämme waren inzwischen von Habs und Mitarbeitern auf Reinheit geprüft, über Agarplatten und durch häufige Passagen in Gurkensaft geschickt worden. Danach wurde erneut auf Acetylcholin geprüft, und die eben mitgeteilten Ergebnisse wiederum völlig bestätigt. Allerdings ließ sich die Probe des Bact. lactis acidi in 2 Stämme aufteilen, von denen der eine vielleicht ein sehr schwacher Acetylcholinbildner ist.

III. Vergleich des Stoffwechsels von Bact. cucumeris fermentati (B_1) und Bact. utile (B_3) mit dem Stamm 10 S des Bact. acetylcholini und 2 acetylcholin-negativen Enterokokken aus Stuhl (St 19, St 20) bei verschiedenen Temperaturen und unter aeroben Bedingungen.

In dieser Versuchsreihe verwandte ich nur solche Stämme, die vorher einer genauen Reinheitsprüfung durch Prof. Habs unterzogen worden waren. Dieser stellte mir auch die Stuhlstämme frdl. zur Verfügung. Leider war es nicht mehr möglich, die Stämme von Orla-Jensen in den Stoffwechselvergleich mit hineinzubeziehen. Die Versuche wurden ganz in der Art der Stoffwechselversuche bei verschiedenen Temperaturen von Möller und Ferdinand ausgeführt. Außer Gesamtmilchsäure, p_H, Acetylcholin wurden noch die flüchtigen Säuren (s. Eyrisch) bestimmt und die direkte Titration (s. Kohlmeier) vorgenommen. Wie schon gesagt, diente zur p_H-Messung nur noch der Jonometer nach Lautenschläger, der gestattete, die Bestimmungen nicht nur entschieden genauer ($\pm$ 0.01 p_H-Einheiten), sondern auch bedeutend rascher durchzuführen.

Die Ergebnisse meiner Messungen in sterilem Gurkensaft sind in der Tabelle III niedergelegt. Betrachten wir zuerst die Verhältnisse bei 15° C, so fällt vor allem die schon von Möller und Mai bei Stuhlstämmen beobachtete Latenzzeit aller Stämme auf. Sie betrug für 10 S 0 bis 1 Tag, für die Hennebergschen Stämme, sowie für Stuhl 19 1—3 Tage, während Stuhl 20 sogar eine solche von 5—9 Tagen aufwies. Bei der Bildung der flüchtigen Säuren war eine 5 bis 9 tägige Latenzzeit sogar allgemein. Die Säuerungsgeschwindigkeit war für alle Stämme anfangs ziemlich gleich, die erreichten Endwerte waren jedoch verschieden. Die Hennebergschen Stämme standen dem Stamm 10 S nur wenig nach, die Stuhlstämme säuerten jedoch bedeutend weniger. p_H, Milchsäure und direkte Titration gingen nicht völlig parallel, die Unterschiede waren aber nicht bedeutend. Die Bildung flüchtiger Säuren war bei allen Stämmen äußerst klein und mit Ausnahme der Stuhlstämme, die nur Werte innerhalb der Fehlergrenze der Methode zeigten, völlig gleich mit denjenigen von Stamm 10 S. Die maximalen Endwerte der Säuerung wurden von keinem Stamm innerhalb der 13 Versuchstage erreicht. Die Acetylcholinbildung war bei allen positiven Stämmen gleich stark und bereits nach dem 3. Tage meßbar.

Tabe

Stoffwechselvergleich von verschiede

	nach Tagen	15° C					25° C					
		1	3	5	9	13	1	3	5	9	13	1
10 S	Acetylcholin	—	++	++	++	++	—	+	+	+	++	-
	Wachstum	—	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+
	dir. Titr. [1])	0.32	0.32	0.64	0.80	1.06	0.34	0.94	1.19	1.39	1.55	0.(
	fl. Säuren [2])	—	—	—	0.03	0.07	—	—	0.06	0.12	0.15	-
	p_H	5.30	4.25	3.91	3.77	3.67	4.33	3.72	3.63	3.55	3.50	3.9
	Milchsäure ‰	0.56	1.83	4.01	4.50	5.62	2.81	4.71	5.48	6.68	7.73	4.1
B 3	Acetylcholin	—	+	++	++	++	—	+	+	+	+	-
	Wachstum	—	+	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+
	dir. Titr.	0.33	0.29	0.41	0.76	1.21	0.27	1.02	1.23	1.27	1.35	0.3
	fl. Säuren	—	—	—	0.05	0.10	—	—	0.06	0.15	0.17	-
	p_H	5.28	5.38	4.19	3.84	3.73	5.34	3.74	3.65	3.60	3.57	4.0
	Milchsäure ‰	0.70	0.56	2.67	4.50	6.33	1.06	4.29	5.91	6.40	6.82	2.5
B 1	Acetylcholin	—	+	++	++	++	+	++	++	++	++	-
	Wachstum	—	+–?	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+
	dir. Titr.	0.28	0.26	0.27	0.59	0.78	0.28	0.75	1.12	1.40	1.56	0.3
	fl. Säuren	—	—	—	0.03	0.09	—	0.06	0.12	0.21	0.28	-
	p_H	5.26	5.44	4.56	4.03	3.86	5.55	3.88	3.70	3.57	3.52	4.3
	Milchsäure ‰	0.28	0.84	2.74	4.08	6.05	1.41	4.50	5.20	6.54	7.17	2.4
St. 19	Acetylcholin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-
	Wachstum	—	+	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+
	dir. Titr.	0.23	0.24	0.29	0.43	0.62	0.45	0.62	0.62	0.70	0.70	0.4
	fl. Säuren	—	—	—	—	0.01	—	—	0.04	0.05	0.06	-
	p_H	5.26	5.31	4.47	4.27	4.17	4.24	4.06	3.97	3.97	3.98	4.1
	Milchsäure ‰	0.28	1.41	2.95	3.16	3.52	3.02	4.01	4.22	4.08	4.22	3.(
St. 20	Acetylcholin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-
	Wachstum	—	—	—	++	++(+)	++	++	+++	+++	+++	+
	dir. Titr.	0.24	0.24	0.26	0.28	0.45	0.46	0.51	0.59	0.60	0.63	0.4
	fl. Säuren	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.02	0.02	
	p_H	5.28	5.26	5.42	4.43	4.32	4.32	4.08	4.06	4.07	4.03	4.5
	Milchsäure ‰	0.28	0.42	0.42	2.46	3.87	3.09	3.59	3.66	3.87	4.92	3.

[1]) direkte Titration = ccm m/20 NaOH pro ccm

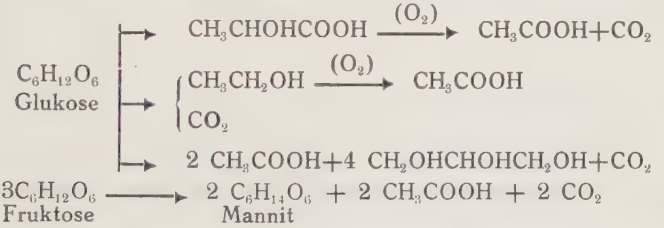
[2]) flüchtige Säuren = ccm m/20 NaOH pro 5 ccm

III.

Stämmen in Gurkensaft ($p_H = 5.27$)

38° C				40° C					46° C				
3	5	9	13	1	3	5	9	13	1	3	5	9	13
+	+	+	++						—	—		—	—
++	+++	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
0.90	1.22	1.23	1.27						0 31	0.31	0.31	0.31	0.31
	0.06	0.10	0 15						—	—	—	—	0.03
3.65	3.59	3.57	3.58	5.29	5.30	3.88	3.62	3.61	5.24	5.11	5.10	5.03	4.92
4.71	5.91	6.12	6.33						0.49	0.49	0.49	0.49	0.56
+	+	+—	+						—	—	—	—	—
++	+++	+++	+++	—	++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
0.98	1.08	1.14	1.36						0.30	0.30	0.31	0.32	0.37
0.03	0.06	0.10	0.11						—	—	—	—	0.03
3.65	3,65	3.64	3,63	5.29	4 37	3.68	3.59	3.56	5.21	5.12	5.06	5.02	4.86
4.57	5.62	6.19	7.38						0.42	0.42	0.42	0.49	0.49
+	++	++	++						—	—	—	—	—
++	+++	+++	+++	—	++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
1.20	1.59	1.61	1.63						0.26	0.29	0,30	0.30	0.42
0.12	0.20	0.22	0.27						—	—	0.03	0.03	0.06
3.61	3.50	3.50	3.48	5.34	4.22	3.85	3.58	3.57	5.21	5.12	5,06	4.88	4.82
5.84	7.38	7.73	7.80						0.28	0.28	0.35	1.20	1.34
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
0.59	0.60	0.64	0.73	0.39	0.58	0.57	0.66	0.75	0,28	0.28	0.28	0.29	0.31
—	0.01	0.02	0.06	—	—	—	0,01	0.08	—	—	—	—	—
4.05	3.99	3.99	4.00	4.26	4.09	4.08	4 07	4.04	5.16	5.11	5.04	4 96	4.82
4.08	3.87	3.87	4.08	3.02	4.01	3.66	3 66	4.22	0,35	0.35	0,35	0.42	0.70
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
0.49	0.52	0.53	0.58	0 45	0.47	0.55	0.52	0.70	0.26	0.26	0.29	0,30	0.37
0.03	0.05	0.05	0.05	—	—	0.01	0,01	0 01	—	—	—	—	—
4.08	4.06	4.08	4.05	4.21	4.11	4.11	4.10	4.09	5.13	5.12	5.04	4.95	4.82
3.66	3.45	3.52	4.22	3.16	3.37	3.66	3.52	4.50	0.28	0.35	0.42	0.49	0.84

In den Versuchen bei Normaltemperatur von 25° C zeichneten sich die Verhältnisse viel klarer ab. Die Latenzzeiten traten nur noch bei den Hennebergschen Stämmen auf und waren bei diesen auf 0 bis 1 Tag verkürzt. In den Endwerten des p_H, der direkten Titration und der Gesamtmilchsäure herrschte praktisch vollkommene Uebereinstimmung, sowohl zwischen den Hennebergschen Stämmen und 10 S, die stark säuerten (p_H = 3.53 $\pm$ 0.03), wie auch unter den 2 Stuhlstämmen, die entschieden schwächer säuerten (p_H = 4.01 $\pm$ 0.03). Die flüchtigen Säuren entstanden bei den Stuhlstämmen nur in Spuren, Bact. utile bildete etwa die gleiche Menge wie 10 S, Bact. cucumeris fermentati fiel jedoch deutlich durch eine schon nach dem ersten Tage einsetzende, anfangs an Geschwindigkeit wenig abnehmende Essigsäurebildung auf, die schätzungsweise mehr als den doppelten Endwert wie bei Stamm 10 S erreichen dürfte. Die Menge an flüchtigen Säuren war aber immer noch gering für ein heterofermentatives Milchsäurebakterium, das Hexosen, wenn auch nur zum Teil, nach folgenden Gleichungen vergärt (Kluyver, Bernhauer):



Die Kohlensäurebildung, die leider nicht quantitativ verfolgt wurde, ist jedenfalls bedeutend. Auf Alkohol wurde nicht geprüft. Die Stärke der Acetylcholinbildung nahm in folgender Reihenfolge ab: Bact. cucumeris fermentati, Stamm 10 S, Bact. utile. Auffallend war, daß Bact. cucumeris fermentati schon nach dem ersten Tage reichlich Acetylcholin gebildet hatte, was bei typischen Stämmen des Bact. acetylcholini bisher nur selten beobachtet wurde.

Bei 38° C weichen die Befunde nur wenig von denen bei 25° C ab Man sieht deutlich, daß Bact. utile und Stamm 10 S bei dieser hohen Temperatur schon etwas geschädigt wurden, während der Stoffwechsel von Bact. cucumeris ferm., besonders seine Essigsäurebildung (hinsichtlich der Anfangsgeschwindigkeit) noch erheblich anstieg. Die Latenzzeit (Wachstum und p_H) war jetzt gänzlich verschwunden. Charakteristisch war auch wiederum der schwache Einfluß der hohen Temperatur auf die Acetylcholinbildung von Bact. cuc. ferm. Bact. utile zeigte dagegen eine deutliche Schwankung der Acetylcholinwerte, die in diesem Fall stärker war als bei Stamm 10 S.

Die Einstellung der kritischen Temperatur von 40° C erfolgte diesmal weit genauer als in der Arbeit von Möller und Ferdinand. Die genaue Temperatur und ihre Schwankung betrug 40.25° C $\pm$ 0.15. Man erkennt aus den weiteren Ausführungen deutlich, daß in diesem Temperaturgebiet eine genaue Temperatureinstellung unerläßlich ist.

Die Schwankungen bei den übrigen Temperaturen seien deshalb hier ebenfalls wiedergegeben: Bei 15° C ± 2°, bei 25° ± 1°, bei 38° C ± 0.15° und bei 46° C ± 2°. Leider konnte bei den 3 acetylcholin-positiven Stämmen nur Wachstum und p_H gemessen werden. Unter den hier vorliegenden genauen Bedingungen zeigte sich also tatsächlich auch bei Stamm 10 S noch Wachstum und Säuerung; es ist allerdings eine Latenzzeit von 3 bis 5 Tagen dazu erforderlich. Die Latenzzeit ist für die beiden Hennebergschen Stämme nur 1 bis 3 Tage, während die Stuhlstämme überhaupt keine Latenzzeit aufweisen. Die Endwerte sind kaum anders als bei 38° C.

Bei 46° C endlich findet bei keinem Stamm mehr sichtbares Wachstum, Bildung von Acetylcholin und flüchtigen Säuren statt. Es fallen zwar, frühestens vom 9. Tage an, die p_H-Werte, besonders bei Bact. cuc. ferm. und den Stuhlstämmen (entsprechend bewegen sich Milchsäure und direkte Titration), die Effekte sind jedoch gering (maximal von p_H = 4.86). Diese schwache Säuerung, die auch vielfach bei längerer Bebrütung unbeimpfter steriler Gurkensaftproben auftritt, dürfte wenig interessieren.

IV. Besprechung der Ergebnisse und Ausblick.

Nach den bisherigen Ausführungen scheint es also doch der Fall zu sein, daß die Eigenschaft gewisser Mikroorganismen, auf geeigneten Substraten Acetylcholin zu bilden, nur auf sehr wenige Arten beschränkt ist. Von 27 im Pharmakologischen Institut untersuchten genau definierten Stämmen waren nur 3 acetylcholin-positiv. Diese gehörten sämtlich zu den Milchsäurebakterien. Zwei davon sind homofermentativ, der dritte heterofermentativ. Dieser letztere, das Bact. cuc. ferm., ist nach den hier vorliegenden Untersuchungen hinsichtlich seines Stoffwechsels deutlich vom Bact. acetylcholini zu unterscheiden, während das homofermentative Bact. utile in den bisher untersuchten Stoffwechseleigenschaften völlig mit denjenigen des Bact. acetylcholini übereinstimmt. Es ist sogar recht wahrscheinlich, daß es derselben Rasse angehört, wie die von Möller und Ferdinand untersuchten Silagestämme des Bact. acetylcholini. Das Streptobacterium plantarum, dessen Stoffwechseluntersuchung noch bevorsteht, dürfte auf Grund aller orientierender Versuche nur eine extreme auf das pflanzliche Medium eingestellte Rasse des Bact. acetylcholini sein. Demnach muß ich also das Bact. cuc. ferm. bisher als das einzige betrachten, das neben dem acetylcholinbildenden Enterokokkus zur Acetylcholinbildung befähigt ist. Diese Eigenschaft scheint bei höherer Temperatur beim Bact. cuc. ferm. sogar stabiler zu sein, als bei allen bisher bekannten Stämmen des Bact. acetylcholini. Wenn sich dies in den weiteren Untersuchungen erhärten läßt — die Stabilität des Acetylcholins bis 38° C wurde z. B. nicht in allen Säften beobachtet (s. Tabelle II) — so möchte ich dafür in erster Annäherung die erhöhte Essigsäurebildung verantwortlich machen. Denn nach dem Massenwirkungsgesetz muß eine Erhöhung der Konzentration an freier

Essigsäure das Gleichgewicht zwangsläufig im Sinne einer erhöhten Acetylcholinbildung verschieben. So ermöglichte bereits Decker in azetatarmen Säften durch Zusatz von Ammonazetat die Bildung von Acetylcholin durch den Stamm 10 S. Berücksichtigen wir schließlich, daß die acetylcholin-negativen Enterokokken viel weniger Essigsäure bilden als die Silagestämme, so möchte ich annehmen, daß weitere acetylcholinbildende Bakterien gerade unter den heterofermentativen Milchsäurebakterien zu finden sind.

Die Ergebnisse der Stoffwechseluntersuchungen an acetylcholin-negativen Enterokokken stehen in vollem Einklang mit den Befunden von Möller und Mai. Die hier untersuchten Stämme sind typische, acetylcholin-negative Stämme, keine Uebergangsformen. Sie gleichen am meisten dem Stuhlstamm St 5, dessen Stoffwechsel die oben genannten Autoren untersucht hatten. Da die hier geprüften Stämme jedoch viel besseres Wachstum zeigten als Stamm St 5 von Möller und Mai, so sind die vorliegenden Ergebnisse weit beweiskräftiger für das wirkliche Vorliegen acetylcholin-negativer Enterokokken.

Zusammenfassung.

1. Unter 17 in dieser Arbeit untersuchten Bakterien zeigten nur 3 die Fähigkeit, in sterilem Gurkensaft Acetylcholin zu bilden: Bact. cuc. ferm. (Henneberg), Bact. utile (Henneberg) und Streptobacterium plantarum (Orla-Jensen).
2. Bei sämtlichen 17 Stämmen wurde Säuerung (p_H), Wachstum und Acetylcholinbildung in verschiedenen Pflanzensäften unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 25° und 38° C untersucht.
3. Der Stoffwechsel von 2 acetylcholin-positiven Stämmen (Bact. cuc. ferm. und Bact. utile) wurde in Gurkensaft bei verschiedenen Temperaturen zeitlich verfolgt und verglichen mit dem Silagestamm 10 S und 2 acetylcholin-negativen Enterokokken aus Kot. Dabei zeigte sich, daß
   a) die acetylcholin-negativen Stämme etwas schlechter wuchsen und weniger säuerten als die acetylcholin-positiven,
   b) Bact. utile sich fast völlig gleich verhielt wie Bact. acetylcholini (10 S)
   c) Bact. cuc. ferm. sich durch erhöhte Essigsäure-, starke CO_2- und schnellere Acetylcholinbildung und bei den höheren Temperaturen durch etwas bessere Säuerung, sowie stabilere Acetylcholinbildung vom Bact. acetylcholini (10 S) unterschied.
4. Da also Bact. utile mit großer Sicherheit, ferner Streptobact. plantarum wahrscheinlich identisch mit dem Bact. acetylcholini ist, ist Bact. cuc. ferm. bisher das einzige, das mit gewissen Enterokokkenstämmen die Fähigkeit zur Acetylcholinbildung teilt.

Literatur.

1. W. Keil u. F. Pörtner: Biochem. Z. 280 (1935) 61
2. W. Keil u. L. Weyrauch: Z. Bakt. II 97 (1937) 90
3. E. F. Möller u. R. Ferdinand: Z. Bakt. II 97 (1937) 94
4. E. F. Möller u. J. Mai: Z. Bakt. II (1937) Druckfertig
5. H. Thoma: Dissertation Heidelberg (1937) Vergl. auch 6)
6. H. Habs: Z. Bakt. II (1937) im Druck
7. E. Frey: Dissertation Heidelberg (1937)
8. K. Henneberg: Handb. d. Gärungsbakt. 2. Aufl. Berlin (1926)
9. S. Orla-Jensen: z. B. The lactic acid bacteria. Kopenhagen (1919)
10. G. Ruschmann: Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. XII, Teil II, Heft 4, S. 547 (1934).
11. K. Eyrisch: Dissertation Heidelberg (1937)
12. E. Kohlmeier: Dissertation Heidelberg (1937)
13. A. J. Kluyver: Ergebn. d. Enzymforschung IV (1935) 230 spez. 244.
14. K. Bernhauer: Gärungschem. Prakt. Berlin 1936
15. G. Decker: Dissertation Heidelberg (1937).

Lebenslauf.

Am 4. April 1912 wurde ich als Sohn des Ansiedlers Hermann Niederdeppe (gefallen am 13. 6. 1917 bei Laon) in Schellstein (Prov. Posen) geboren.

Ich besuchte 8 Jahre (Ostern 1918—26) die Bürgerschule in Gerbstedt, danach $4^1/_2$ Jahre (bis Michaelis 1930) die Oberrealschule in den Franckeschen Stiftungen in Halle a. d. Saale. Nach $1^1/_2$ jährigem Besuch der Staatlichen Lutherschule in Eisleben legte ich dort am 1. März 1932 die Reifeprüfung ab.

Nach 8 semestrigem Studium in Rostock, Berlin, Jena, Heidelberg bestand ich am 8. Mai 1937 die zahnärztliche Hauptprüfung.

Von Februar bis Mai 1934 war ich im Arbeitsdienstlager in Lobenstein in Thüringen; von August bis September 1934 in der S. A.-Sportschule in Tännich bei Rudolstadt; von November 1934 bis Oktober 1935 diente ich freiwillig bei der 18. (M.-G.) Kompagnie/Inf. Reg. Halberstadt und im August 1937 wurde ich zur Ableistung meiner I. Reserveübung bei der 4. (M.-G.) Kompagnie/Res. Inf. Bat./XII. A. K. in der Senne (Westfalen) einberufen.